

51457-2000600-10361

DELPHION

Log Out Work Files Saved Searches

RESEARCH

PRODUCTS

INSIDE DELPHION

My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent Help



The Delphion Integrated View: INPADOC Record

☒ PDF | [More choices...](#)

Tools: Add to Work File:

View: Jump to:

☒ Email this to a friend

Title: CN1175282A: AN APPARATUS FOR PERFORMING MAGNETIC CYCLE REACTION

Derwent Title: New appts. for performing a magnetic cycle reaction - used partic. for amplification of specific nucleic acid sequences using mesophilic polymerase enzymes. [Derwent Record]

Country: CN China

Kind: A Unexamined APPLIC. open to Public inspection

Inventor: ALEC MIAN; United States of America
STEPHEN G. KIEFFER-HIGGINS; United States of America

Assignee: GAMERA BIOSCIENCE CORP. United States of America
News, Profiles, Stocks and More about this company

Published / Filed: 1998-03-04 / 1995-12-08

Application Number: CN19959595197573

IPC Code: C12Q 1/68; B03C 1/28; B01J 19/00;

ECLA Code: None

Priority Number: 1994-12-09 US1994000353573

INPADOC Legal Status: None Get Now: Family Legal Status Report

Designated Country: AL AM AP BB BG BR BY CN CZ EE FI GE HU IS JP KE KG KP KR KZ LK LR LT LV AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LI LU

Family:

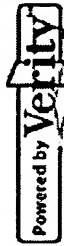
PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
	WO9617959A3	1996-08-29	1995-12-08	AN APPARATUS FOR PERFORMING MAGNETIC CYCLE REACTION



High Resolution

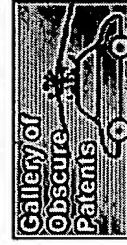
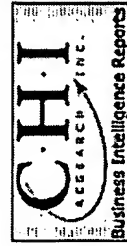
<input checked="" type="checkbox"/>	WO9617959A2	1996-06-13	1995-12-08	AN APPARATUS FOR PERFORMING MAGNETIC CYCLE REACTION
<input checked="" type="checkbox"/>	US5686271	1997-11-11	1994-12-09	Apparatus for performing magnetic cycle reaction
<input checked="" type="checkbox"/>	JP10510158T2	1998-10-06	1995-12-08	
<input checked="" type="checkbox"/>	ES2129241T3	1999-06-01	1995-12-08	UN APARATO PARA REALIZAR UNA REACCION POR CICLOS MAGNETICOS.
<input checked="" type="checkbox"/>	EP0796345B1	1999-03-24	1995-12-08	AN APPARATUS FOR PERFORMING MAGNETIC CYCLE REACTION
<input checked="" type="checkbox"/>	EP0796345A2	1997-09-24	1995-12-08	AN APPARATUS FOR PERFORMING MAGNETIC CYCLE REACTION
<input checked="" type="checkbox"/>	DK0796345T3	1999-05-25	1995-12-08	APPARAT TIL UDFOERELSE AF MAGNETISK CYKLUSREAKTION
<input checked="" type="checkbox"/>	DE69508617T2	1999-07-29	1995-12-08	VORRICHTUNG ZUR DUERCHFUEHRUNG VON MAGNETISCHEN ZYKLUSREACTIONEN
<input checked="" type="checkbox"/>	DE69508617C0	1999-04-29	1995-12-08	VORRICHTUNG ZUR DUERCHFUEHRUNG VON MAGNETISCHEN ZYKLUSREACTIONEN
<input checked="" type="checkbox"/>	CN1175282A	1998-03-04	1995-12-08	AN APPARATUS FOR PERFORMING MAGNETIC CYCLE REACTION
<input checked="" type="checkbox"/>	CA2207388AA	1996-06-13	1995-12-08	AN APPARATUS FOR PERFORMING MAGNETIC CYCLE REACTION
<input checked="" type="checkbox"/>	AU4517596A1	1996-06-26	1995-12-08	AN APPARATUS FOR PERFORMING MAGNETIC CYCLE REACTION
<input checked="" type="checkbox"/>	AU0691076B2	1998-05-07	1995-12-08	AN APPARATUS FOR PERFORMING MAGNETIC CYCLE REACTION
<input checked="" type="checkbox"/>	AT0178098E	1999-04-15	1995-12-08	VORRICHTUNG ZUR DUERCHFUEHRUNG VON MAGNETISCHEN ZYKLUSREACTIONEN
15 family members shown above				

Other Abstract
Info:



THOMSON

CHEMABS 125(09)107038V CHEMABS 128(02)010870J DERABS C96-287202



Nominate this for the Gallery...

Copyright © 1997-2005 The Thomson Corporation
Subscriptions | Web Seminars | Privacy | Terms & Conditions | Site Map | Contact Us | Help

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C12Q 1/68

B03C 1/28 B01J 19/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95197573.0

[43]公开日 1998 年 3 月 4 日

[11] 公开号 CN 1175282A

[22]申请日 95.12.8

[30]优先权

[32]94.12.9 [33]US[31]08 / 353,573

[86]国际申请 PCT / US95 / 16256 95.12.8

[87]国际公布 WO96 / 17959 英 96.6.13

[85]进入国家阶段日期 97.8.8

[71]申请人 盖默拉生物科学公司

地址 美国马萨诸塞州

[72]发明人 亚里克·梅恩

斯蒂芬·G·基弗-希金斯

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

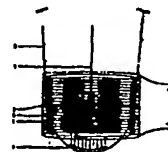
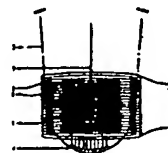
代理人 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图页数 11 页

[54]发明名称 一种进行磁循环反应的装置

[57]摘要

本发明提供了一种用于进行扩增特异核酸序列的方法的装置，该方法是以通过施加电磁场来分离核酸链为基础的。该分离方式使得可在扩增过程中应用中温聚合酶，从而增加可扩增的靶核酸的大小，也增加扩增过程的速度和保真性。



(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 一种进行磁循环反应的装置, 该装置包括以下元件的组合:

5 (a) 一个恒温样品元件, 其包括一个具有一组多个样品管槽的平板, 以及用来控制样品元件的温度的装置, 其中, 一些磁循环反应样品管装在样品管槽里;

(b) 第一磁元件, 其中, 该第一磁元件位于样品元件的上方并与之接近, 其中该第一磁元件包括一组多个线圈, 其中这些线圈包括有多匝围绕软铁心的导电金属丝, 并且其中通过组成线圈的金属丝的电流产生围绕第一磁元件
10 的磁场;

(c) 第二磁元件, 其中该第二磁元件位于样品元件下方并与之接近, 其中该第二磁元件包括有一组多个线圈, 其中这些线圈包括有多匝围绕软铁心的导电金属丝, 并且其中通过组成线圈的金属丝的电流产生围绕该第二磁元件的磁场;

15 (d) 一个控制器, 其包括一个微处理器, 其中该控制器被操作地连接到恒温样品元件以及第一和第二磁元件的每一元件上, 其中该控制器还被操作地连接到一个用户界面上, 并且该控制器控制流过每个磁元件的电流和恒温样品元件的温度;

(e) 一个电源, 其被操作地连接到控制器上, 并且对该装置供电。

20 2. 一种应用权利要求 1 的装置进行磁循环反应来扩增特异 DNA 片段的方法, 该方法包括:

(a) 将固相引物结合到一条与靶核酸互补的核酸链中, 产生了结合于靶核酸上的固相链;

(b) 分离固相链和靶核酸;

25 (c) 将磁性引物结合到与固相链互补的核酸链中, 产生具有一条固相链和一条磁性链的双螺旋;

(d) 通过在权利要求 1 的装置的第一磁元件中产生磁场, 施加场强足以分开双螺旋的电磁场来将固相链和磁性链分开;

30 (e) 通过在权利要求 1 的装置的第二磁元件中产生磁场来施加电磁场, 使与固相链互补的磁性引物与固相链退火, 并使与磁性链互补的固相引物与磁性链退火;

(f)用合适的 DNA 聚合酶来延伸退火的引物; 以及

(g)将步骤(d)-(f)重复必需的次数来获得所需量的扩增的 DNA。

3. 一种用权利要求 1 的装置扩增特异单链靶核酸的方法, 该方法包括以下步骤:

5 (a)把磁性引物结合到与靶核酸互补的核酸链中, 产生与靶核酸结合的磁性链;

(b)把磁性链与靶核酸分开;

(c)把固相引物结合到与磁性链互补的核酸链中, 产生有一条固相链和一条磁性链的双螺旋;

10 (d)通过在权利要求 1 的装置的第一磁元件中产生磁场施加场强足以分离双螺旋的电磁场, 来将固相链和磁性链分离;

(e)通过在权利要求 1 的装置的第二磁元件中产生磁场, 来使与固相链互补的磁性引物与固相链退火, 并使与磁性链互补的固相引物与磁性链退火;

(f)用合适的 DNA 聚合酶使退火的引物延伸; 以及

15 (g)将步骤(d)-(f)重复必需的次数, 来获得所需量的扩增 DNA。

4. 一种用权利要求 1 的装置扩散特异双链靶核酸的方法, 该方法包括以下步骤:

(a)将靶核酸链分开, 产生第一链和第二链;

20 (b)把固相引物结合到与第一链互补的链中, 产生有第一链和固相链的第一异源双链, 并将磁性引物结合到与第二链互补的链中, 产生具有第二链和磁性链的第二异源双链;

(c)分开第一异源双链和第二异源双链的链;

(d)使与固相链互补的磁性引物与固相链退火, 并使与磁性链互补的固相引物与磁性链退火;

25 (f)用合适的 DNA 聚合酶使退火的引物延伸; 并且

(g)通过在权利要求 1 的装置的第一磁元件中产生磁场施加场强足以分开双螺旋的电磁场, 将固相链与磁性链分开;

(h)通过在权利要求 1 的装置的第二磁元件中产生磁场, 使与固相链互补的磁性引物与固相链退火, 并使与磁性链互补的固相链与磁性链退火;

30 (i)用合适的 DNA 聚合酶来使退火的引物延伸;

并且

(j)将步骤(g)-(i)重复必需的次数, 来获得所需量的扩增的 DNA。

一种进行磁循环 反应的装置

5

本申请是 1994 年 6 月 9 日提出的美国专利申请顺序号 08/074, 345 的部分继续申请。

本发明涉及扩增特异的核酸序列。更具体地讲, 本发明涉及用本文中称作磁循环反应的反应剂和方法来扩增这样的特异核酸序列。尤其是, 本发明
10 涉及一种用于进行这样的磁循环反应以体外扩增特异核酸序列的装置。

能够扩增特异的 DNA 序列已大大促进了分子生物学、药学以及法医学领域的发展。被称作 PCR 的扩增特异 DNA 序列的早期方法是利用双链 DNA 分子热变性、然后是引物与单链的降低温度退火以及通过聚合酶使引物延伸而重新产生双链的交替循环。Mullis 在美国专利号 4, 683, 202(1987)中公开
15 了这一方法, 其中在两个循环之间必须加入新的聚合酶, 来替代由于热变性步骤的温度升高而失活的聚合酶。Mullis 等人在美国专利号 4, 683, 195(1987)中讲述了应用这一方法来检测样品中某一特异核酸序列的存在或缺乏, 或者应用这一方法来鉴别样品中不同的特异核酸序列。

这些早期方法有很大不便, 即在两个循环之间必须加入聚合酶。这一不便
20 通过发现一种纯化的热稳定性 DNA 聚合酶而被克服。Gelfand 等人在美国专利号 4, 889, 818(1989)中公开了从嗜热细菌栖热水生菌(*Thermus aquaticus*)纯化的一种热稳定性聚合酶。Mullis 等人于美国专利号 4, 965, 188(1990)中公开了一种利用热稳定性聚合酶扩增特异 DNA 序列的方法, 因而避免了在两个循环之间必须加入聚合酶。Johnson 等人在美国专利号 5,038,852(1991)
25 中公开了一种自动进行利用该热稳定性聚合酶的聚合酶链式反应的装置。

在以热变性为基础的链式反应中应用热稳定性聚合酶已减少扩增特异核酸序列的不便, 并且有助于这一方法具有大的经济上的可接受性。遗憾的是, 由于热变性步骤而必需的对热稳定性酶的应用已对该扩增方法造成严重限制。这些限制中最主要的是扩增方法的保真性、可扩增的核酸序列的大小,
30 以及进行扩增反应需要的时间。该热稳定性聚合酶比很多已知的中温来源的聚合酶更易在引物延伸反应中出现错误。在为克隆而预备应用该扩增方法

时，这可能是不可忽视的问题。此外，已成功地用热稳性聚合酶扩增的核酸序列仅仅大约 10 千碱基(kb)或更少。最后，该热稳定性聚合酶是以极低的速率来聚合脱氧核苷三磷酸。加上热变性和退火步骤所需的不多的时间，这一缓慢的聚合反应的结果是扩增过程要用数小时。

- 5 因此，需要有一种克服以热循环为基础的方法的缺陷的、扩增特异核酸序列的方法。理想的是，该方法应该减小可扩增的靶核酸的大小，也减少扩增过程所需的时间。最优选的是，该方法应该是依赖于结构上相对简单的仪器。该方法是由在于 1994 年 6 月 9 日提出的、共同拥有的、待批的美国专利申请顺序号 08/074, 345 中公开的磁循环反应构成的。磁循环反应的成功使能
- 10 有效进行这些反应的装置成为必需。

- 本发明提供了一种使扩增特异核酸序列的方法成为可能的装置，该方法比现有方法要快、具有更大的保真性，并且能扩增大得多的靶核酸。文中将这一新方法称为“磁循环反应”或“MCR”。MCR 的优点是由于其利用电磁而达到扩增所必需的链分离。使用电磁来分离链避免了必需在灭活聚合酶
- 15 的条件下进行扩增过程。因此，本发明提供了方便，即不用热稳定性聚合酶，而可以用中温聚合酶来不停地循环扩增特异的核酸序列。这些中温聚合酶以比已知热稳定性聚合酶至少快 1.5 个数量级的速率来催化序列延伸。此外，这些中温聚合酶比热稳定性聚合酶有大得多的保真性。而且，中温聚合酶比热稳定性酶要更有持续力，可扩增长达 100 或 100 以上 kb 的靶核酸。因此，
- 20 本发明提供了特异核酸的扩增方法，它比现有的不间断方法更快更准确，并且可用于扩增大得多的靶核酸序列。

 本发明提供了一种进行磁循环反应的装置，它包括以下元件的组合：

 一个恒温样品元件。它包括一块具一系列多个样品管槽的板和用来控制样品元件温度的装置；其中，磁循环反应样品管被放置在样品管槽中。

- 25 第一磁元件。其中，该第一磁元件位于样品元件上方并与之接近。其中，该第一磁元件包括一组多个线圈。其中，这些线圈包括围绕软铁心的多匝导电金属丝，并且，其中通过组成线圈的金属丝的电流通量产生环绕该第一磁元件的磁场；

- 第二磁元件。其中，该第二磁元件位于样品元件下方并与之接近。其中
- 30 该第二磁元件包括一组多个线圈。其中，该线圈包括围绕软铁心的多匝导电金属丝，并且其中通过组成线圈的金属丝的电流通量产生环绕该第二磁元件

的磁场;

一个控制器。其包括一个微处理器。其中,把该控制器操作地连接到恒温样品元件以及第一磁元件和第二磁元件的每一个上。其中,该控制器也被操作地连接到用户界面上,并且该控制器控制着通过每一个磁元件的电流量、也控制着恒温样品元件的温度;

以及

一个电源。其被操作地连接到控制器上,并向该装置提供电源。

在一个优选的实施方案中,每个磁元件包括一个铝块,该铝块包括一组电磁线圈,每一线圈包括一枚软铁心,其中每个线圈还包括一个围绕软铁心的多匝导电金属丝。在一个优选的实施方案中,把每一多数线圈放入铝块的多数孔中。在更优选的实施方案中,把铝块固定到软铁片上,该软铁片具有与该元件相同的平面尺寸,并被沿着该块的长的表面固定。

在另一个优选的实施方案中,该恒温样品元件包括一个铝块,该铝块包括多个磁循环反应样品管槽。在一优选的实施方案中,该多个样品管槽能够容纳一些容量为 1.5ml、0.6ml、0.2ml 的磁循环反应样品管,或者混合容纳类似大小的样品管。此外,恒温样品元件有利于与加热和冷却装置进行热接触,其中该加热和冷却装置能够把样品元件保持在恒温,即在大约 1 °C 的(优选为 0.5 °C)温度范围内。

对本发明的装置的控制和与用户联系的对磁循环反应的控制是由包括有一个微处理器的控制器来提供的。在一个优选的实施方案中,该控制器还包括有随机存取存储器(RAM)的能力,各步骤的自动控制程序的可执行文件包括:例如,磁循环反应以及用户拟定微处理器程序的用户界面。该装置还包括有一个电源,其中把交流电转化成直流电以向操作恒温样品元件的加热和冷却装置、也向操作该装置的每一个磁元件提供适宜的电压。

在应用文中公开的装置的方法中,本发明通过利用具有两种不同的结合粒子的引物类型达到了将核酸链电磁分开。第一种引物类型被称作“固相引物”,其引物被物理地连接到固相或固定的粒子或表面上。第二种引物类型被称为“磁性引物”,其实际上是一种被物理地连接到对电磁场有反应的粒子上的引物。在本发明方法的开始的步骤中,该固相引物和磁性引物被结合到靶核酸序列中,即被结合到被称作固相链和磁性链的链中。对于单链靶序列,这一步骤需要一个通过间插变性步骤,由固相和磁性引物的聚合酶延伸彼此

避开。对于双链靶核酸序列，利用了同样的开始的聚合酶引物延伸步骤，但
5 每一步骤前部有变性步骤。这些步骤产生了一端被结合到固相粒子(通过固相
链的 5'端)和另一端被结合到磁性粒子(通过磁性链的 5'端)的靶核酸。一旦获得
这样的靶核酸，就可以通过多次循环来进行扩增：先利用磁场分离固相链和
磁性链，再使加入的固相引物和磁性引物与分离的链退火，最后由退火的引
物进行常规聚合酶延伸。

在应用本发明的装置进行磁循环反应中，多个扩增循环的进行是通过先
由在本装置的第一(或上方的)磁性元件中产生磁场而向恒温样品元件中的每
个样品施加磁场。以供给一定电压的通过组成第一磁元件的电磁体的导电金
10 属丝的直流(DC)电流来产生足够强度的磁场，来将固相链和磁性链分开。然
后，通过中断通过第一磁元件的电流来消除第一磁元件的磁场。通过在该装
置的第二(或下方的)磁性元件中产生磁场而向恒温样品元件中的每一样品施加
磁场，使加入的固相引物和磁性引物与分离的链退火。这一磁场是以供给一
定电压的通过组成第二磁元件的电磁体的导电金属丝 DC 电流来产生的，该
15 磁场强到足以有效地使磁性引物与与固相连接的 DNA 模板链接近。通过中
断第一和第二磁元件中的电流，使聚合酶介导的(优选为中温聚合酶介导的)
退火引物的延伸在无外在磁场的条件下进行。每一步骤进行一段被确定为最
适于待扩增的特异核酸变性、退火和延伸的时间。然后，如所述的，重复变
性、退火和延伸的循环，直至扩增出足够量的感兴趣的 DNA。

20 由于本发明提供的装置而变得更为方便的扩增方法可用于多种目的。首
先，这一方法可用于诊断目的，由此来检测样品中的特异靶核酸序列的存在
或缺乏。在这一应用中，根据本发明，与现有扩增方法相比较，由于更快地
将靶核酸链分开以及中温聚合酶的更快的聚合速度，该方法提供了更快的诊
断手段。第二，根据本发明，该扩增方法更可以以比可能的利用现有扩增方
25 法的方式更快的方式，来定量测定样品中特异靶核酸的量。本发明的方法也
可用于制备目的，如产生用来克隆、序列分析以及产生突变的特异靶核酸底
物。在这一应用中，本发明的扩增方法要优于现有方法，这不仅是因为这一
方法更快捷，也因为中温聚合酶的忠实性致使制备的底物中的突变更少。此
外，本发明的扩增方法可用于核酸作图，使用现有扩增方法来进行这一应用
30 是不可能的。与应用持续性较差的热稳定性聚合酶可获得最大约 5 - 10 千碱
基相比较，应用中温聚合酶，可长达 100 - 200 千碱基长的核酸更大持续，

由此使核酸作图这一应用成为可能。根据本发明，应用该扩增方法会补充或替代现有的作图方法，如酵母人工染色体克隆方法。

还会认识到的是，由本发明提供的装置可用于其他与扩增有关的技术的操作中，包括连接酶链式反应(LCR)、一对沃森-克里克互补DNA链对中的一条链的不对称扩增以及DNA循环测序法，但不限于这些。本领域的技术人员会认识到本发明的装置还有另外的有利的用途。

在本申请的以下部分和附图中，对有利的、由于本发明的装置而变得更便利的磁循环反应扩增方法的实施方案进行了更为详细的描述，也对本发明的装置的一些优选实施方案进行了更为详细的描述。

10 附图的简要说明：

图1是利用双链靶核酸的磁循环反应的基本步骤的流程图。步骤1和2是变性和延伸步骤。长的实线表示原来的靶核酸链。短的实线表示引物。引物端部的星号和圆分别表示结合的磁性粒子和固相表面。虚线表示引物延伸产物。步骤5表示靶链的电磁脉冲分离，然后是加入的磁性引物和固相引物(与模板)的退火以及聚合酶指导的引物的延伸。

图2所示的是如何达到将磁性粒子结合的靶链和固相粒子结合的靶链进行电磁分离的一般示意图。筒形线圈(1)卷绕着检测管(2)，管(2)中发生扩增过程。以一个方向供给通过筒形线圈的电脉冲，产生沿长箭头方向的磁场(3)。一条靶链与固相表面(4)的结合，阻止了该链随磁场而活动。相反，另一条靶链由于其被连接到磁性粒子(5)上而被磁场从第一条靶链分离。电脉冲反向产生沿由短箭头所示的相反方向的磁场(6)，它使磁性粒子结合的链和引物(7)返回到固相粒子结合的靶链的附近。

图3所示的是本发明的装置的框图。图A表示两个磁元件中的每一个相对于恒温样品元件的配置。图B表示本发明的装置的各个元件之间的操作联

结。

图4表示的是组成本发明的装置的各个磁元件的示意图。图A表示电磁线圈的一个优选实施方案的大小，电磁线圈由1875匝AWG 36磁性金属丝缠绕软铁心组成。图B表示一个13cm × 9cm × 1.25cm铝块中的4 × 6列共24个电磁线圈的大小。

图5所示的是通过本发明的装置进行的磁循环反应(MCR)的方法的框图。控制器启动该系统，由存储器或由用户界面找到系统参数，使样品元件

达到指定的温度，并启动一系列磁循环反应，该系列反应包括在反复的过程中混合、延伸和分离，直至已达到指定的循环次数。该控制器还监控每一循环以及该循环的各个分步的持续时间、控制流向磁元件的电流、监控样品元件的温度并指导加热和冷却装置的工作以达到一致的温度。

5 图 6 所示的是实施例 4 中所述的实验中应用的实验流程。该图说明 A(A 槽)型和 B(B 槽)型的两个代表性的槽，每一个槽中有多个已在每一个 DNA 分子的 5'端被共价连接的 750 个核苷酸的单链 DNA 分子。B 槽的 DNA 分子被放射性标记(由星号所示)，而 A 槽的 DNA 分子则不被放射性标记。在该实验方案的第 2 个步骤中，在每个 A 槽和 B 槽中，与被共价连接了 750 个核苷酸的 DNA 分子的 3'部分互补的多个 500 核苷酸单链 DNA 分子，与 750 核苷酸的 DNA 分子退火。该 500 核苷酸的 DNA 分子在 5'端被生物素化，并被非共价地连接到覆盖了链霉抗生物素蛋白的磁性粒子上。然后在本方案的步骤 3 中，在有(A 槽)或无(B 槽)放射性标记的核苷酸前体存在下，用 T₇ DNA 聚合酶延伸这些 DNA 分子。

15 在步骤 4 中，于 50℃下，通过施加外加的磁场将两条 DNA 链分开，并将分开的、延伸的、与磁性粒子连接的链分离，来进行电泳分析。分离后，于 90℃下洗脱该槽并回收 DNA 来进行电泳分析。

图 7 所示的是根据实施例 4 所产生的 DNA 片段的电泳分析结果。左边的第 1 个电泳分析图谱是由电泳 750 个核苷酸的模板 DNA 而形成的，并示为对照。用箭头指示电泳槽起始位置以及 750 和 500 核苷酸的 DNA 片段的位置。指示出由 A 和 B 槽的每一槽通过磁性链分离(50℃)以及热变性(90℃)回收的 DNA 的各电泳带型。

25 本发明涉及特异靶核酸序列的扩增。本发明提供了用于进行类似的特异核酸扩增的新的反应剂和新方法。本发明特别提供了进行体外扩增特异核酸的方法的装置，该体外扩增特异核酸的方法被称作磁循环反应，在文中和于 1993 年 6 月 9 日提出的并且文中引入为参考的共同拥有的且待批的美国专利申请顺序号 08/074,345 中公开了此方法。

30 在第一个方面，本发明提供了进行磁循环反应的装置。在第二个方面，本发明提供了进行磁循环反应以扩增特异 DNA 片段的装置。在第三个方面，本发明提供了扩增特异单链靶核酸的装置。在第四个方面，本发明提供了扩增特异双链靶核酸的装置。在第五个方面，本发明提供了进行连接酶链

式反应的装置。在第六个方面，本发明提供了进行核酸的不对称磁循环反应的装置。在第七个方面，本发明提供了进行核酸测序的磁循环反应装置。

本发明的装置由2个磁元件中的每一个，一个恒温样品元件，与加热和冷却装置热接触，一个控制器，被操作地连接到2个磁元件中的每一个样品
5 元件以及电源上组成。对本发明来说，本发明的装置可被称作“磁循环反应器”或“MCR器”，不反对将其用于进行其他的有关体外扩增反应。

组成本发明装置的磁元件由一组电磁体方便地组成，其中这组电磁体包括大约1 - 400的电磁线圈。将线圈成形能产生最强的磁场力。由组成每一
10 磁元件的磁性线圈产生的磁场力的总和能够产生足够的力量来分开(变性)被共价地连接到铁磁珠子或粒子上的DNA片段。由以下公开(在美国专利顺序号08/074,345中)的计算可以了解到磁力的总和至少为 6.1×10^{-10} 牛顿(N)。该磁元件的一个优选实施方案是4 × 6列共24个、并能产生大约 7×10^{-7} N力的电磁线圈。

每一个磁线圈包括一个缠绕着一定数量的导电金属丝的软铁心。适宜的
15 导电金属丝包括规格在AWG 14 - AWG 38之间的(最优选是规格为AWG 36的)磁线，但不限于这些规格。将一定数量的金属丝缠绕该软铁心，其中丝的圈数为大约50 - 5000匝。在一个优选实施方案中，将AWG 36的金属丝绕着1cm高 × 0.5cm厚的软铁心缠1875次。

或者，该磁元件包括一对配置在样品元件的上方或下方的永久磁体。在
20 这些实施方案中，通过将这样的永久磁体移近样品元件来对样品元件施加磁场，并通过将永久磁体从样品元件移走来机械地除去磁场。会明了的是，在这些实施方案中，用来相对样品文件独立地移动每个磁体的工具，是本发明的装置的一个组件。

将两个磁元件装在恒温样品元件附近，其中一个称作第一磁元件的磁元
25 件被配置在样品元件的上方，并靠近磁循环反应样品管；另一个称作第二磁元件的磁元件被配置在样品元件的下方的一个靠近磁循环反应样品管底部的位置。所提供的样品元件具有与两个磁元件中每一个大约相等的尺寸，以便在向电磁体供给电流时产生的外加磁场有最大的一致性。该样品控制元件可由任何非铁磁性的材料制成，包括塑料、玻璃、金属，最优选为铝，但不限
30 于这些。该样品元件由多个样品管槽组成，这些槽一般在样品元件的一面钻入，在元件的这一面上从一头到另一头成规则的列来排列。该样品元件被钻

至能够容纳多种样品管的大小，这些样品管的容量为 1.5ml、0.6ml、0.2ml 或其组合。或者，可将样品元件布置以便容纳样品板，如 96 - 孔微量滴定板或其他具孔的样品板或容器。

通过操作与样品元件热接触的加热和冷却装置使样品元件恒温。该元件
5 的温度是由控制器通过借助能向控制器输送温度信息的热电装置，最优选为热敏电阻进行反馈控制来监控的。用来控制该元件温度的便利的加热装置包括，特别是，电阻加热元件。用来控制样品元件的温度的冷却装置包括，特别是，风扇和散热器，最优选为 Peltier 热泵。

该装置是用包括一个可编程微处理器的控制器来监控和控制的。合适的
10 微处理器包括那些可从 Intel 公司购买的[如 286 -、386 -、486 - 且最优选为 586(称作 Pentium)微处理器]、在 25 - 100MHz 之间运作的微处理器。便利的控制器还包括随机存取的存储器，存储空间在 4 兆字节(MB) - (最优选为)64MB。本发明的装置的合适的控制器还装配有用户界面，如由 Omega Engineering Corporation (Stamford, CT)提供的那些用户界面，来对这样的反应的
15 的参数提供完备的控制，反应参数如温度、磁场力、反应循环的次数以及每一循环的持续时间，包括变性、退火和聚合酶介导延伸的每一步骤持续时间。该控制器被操作地连接到两个磁元件以及样品元件的加热和冷却装置上。该控制器还被操作地连接到电源上，该电源便利地提供 12V 和 5 - 10A 的直流电流。

20 图 5 提供了磁循环反应程序的流程图。这组程序的每一步骤为控制温度、磁场力以及磁循环反应每一步骤的持续时间提供了逻辑线路。

本发明提供了一种使改进了的进行特异靶核酸序列扩增的方法更为便利的装置，该方法比现有方法更快捷，有更大的保真性，并且能够扩增多得
25 多的靶核酸。这些对现有扩增方法的改进来自用电磁力来实现扩增所必需的链的分离。因此，这一新方法被称为“磁循环反应”或“MCR”。

该用于扩增单链靶核酸的 MCR 方法中涉及的基本步骤如下。首先，把固相或磁性引物结合到与靶核酸序列互补的核酸链中。这一步骤产生具有一
30 条要么与固相引物要么与磁性引物结合的链的双链靶核酸，分别为固相链或磁性链。第二，变性该靶核酸链和其互补链。第三，均未结合到互补链中的磁性或固相引物被结合到一条与靶核酸序列同源的，即与固相链或磁性链互补的链中。这些步骤产生的双链核酸序列，其有一条结合于固相引物上的链

(固相链)和另一条结合于磁性引物上的链(磁性链)。第四,通过施加磁场将两条链彼此分开,其中固相链是不动的,而磁性链是活动的。在利用本发明的装置进行的这一步骤中,控制通过组成第一(或上部)磁元件的电磁体的线圈的直流电流于足以分开这两条链的磁场力下并持续一段时间,由此来施加磁
5 场。第五,使分离的链与另外的固相链及磁性引物退火。在利用本发明的装置进行的这一步骤中,控制通过组成第二(或底部)磁元件的电磁体的线圈的直流电流于足以使磁性引物与和固相引物连接的模板链再结合的磁场力下并持续一段时间,由此来施加磁场。在这一步骤中,使固相链与一段和其 3'端互补的磁性寡核苷酸引物退火,并使磁性链与固相引物退火,该引物和磁性
10 链的 3'端互补。第六,通过聚合酶使与固相链及磁性链退火的引物延伸,产生更多的双链核酸的拷贝,这些双链核酸有一条结合到固相引物上的链和一条结合到磁性引物上的链。第七,将步骤四至步骤六重复要获得需要数量的核酸拷贝所必需的次数。

除开以下在起始步骤中的修改之外,用于扩增双链靶核酸序列的 MCR
15 方法所包括的基本步骤与扩增单链靶核酸序列的基本步骤相同。首先,必需用一个在先的变性步骤来将两条靶核酸彼此分离。然后,使分离的靶核酸与引物退火,其中一条链与固相引物退火,另一条链与磁性引物退火。下一步,用聚合酶使引物延伸。这些在先的步骤产生两种双链靶核酸,其中之一有一条链为固相链,另一个有一条链为磁性链。如以上扩增单链靶核酸的步骤二
20 至步骤七中所述来进行本方法的其余步骤。

对于本发明,“把一个固相或磁性引物结合到一条核酸链中”这一措词是指将该引物与一条核酸链杂交,该核酸链与待合成的链互补,然后在有脱氧核糖或核糖核苷三磷酸存在下,利用聚合酶使引物延伸。

对于本发明,“磁性引物”一词是指寡核苷酸引物,该引物被共价地连
25 接到对磁场有反应的粒子上。这样的磁性引物中,优选可用的粒子的例子包括铁蛋白分子以及其他大到足以具有两极瞬间的金属粒子,如 DynabeadTM 顺磁粒子(Dynel, Oslow, Norway)。该粒子的大小应该足以由所产生最大的力,来将结合到该粒子上的链与结合到固相粒子上的不动的互补链分开。对于任何给定的粒子,可以根据经验测定其速率,并由 Stoke 关系式计算最大
30 力, Stoke 关系式:

$$F_M = 6 \pi \eta r V$$

其中， r 为粒子的半径， n 是用来扩增的缓冲液的粘度，并且 V 是未结合的粒子通过缓冲液的测定速率。对于本发明，“固相引物”一词指结合于固体或不动相上的寡核苷酸引物。在一个优选实施方案中，该固相是可控孔度玻璃(CPG)，并且引物是以用于合成寡核苷酸的常规方法结合到固相上的。在另一优选实施方案中，引物是通过受体-配体相互作用而间接地连接到固相上的。在本实施方案中，将一受体共价地连接到固相上，并且其配体被共价地连接到引物上，或者，反之亦然。因此，引物是通过非共价的受体-配体结合而被结合到固相上的。由于与固相的结合必须很强，受体-配体亲和性必须很大，如亲和素-生物素体系的亲和性，其亲和性为大约 10^{15} /摩尔。本发明的引物优选为共价结合到磁性粒子、固相表面、受体或配体上。这样的结合可以是以各种方式进行，并且在一个优选实施方案中，其涉及寡核苷酸的5'-羟基。引物的长度通常是用于熟知的聚合酶链式反应的引物的一般长度，优选为大约8-50个核苷酸。对于本发明，“磁性链”是一条具有结合的磁性引物的核酸链，“固相链”则结合了固相引物。

在本发明方法中，在结合固相和磁性引物二之前，可以以多种方法对双链靶核酸进行变性作用。在一个优选的实施方案中，可以用热的方法来达到这种变性，例如，通过使样品处于94℃的温度下大约1-5分钟(优选为大约2分钟)来达到变性。在另一个实施方案中，可以通过将样品暴露给碱，优选于大约13-14的pH值的条件下来达到变性。在第一种情况下，随后的固相或磁性引物与分离了的链的退火是在有过量引物的存在条件下通过把温度降低至解链温度(T_m)以下来达到的，通常为大约45℃-60℃，持续多至5分钟。在第二种情况下，退火是在有过量引物存在下、通过使样品处于中性pH值，优选大约pH7-9来进行的。在任一种情况下，比靶核酸摩尔数过量的引物优选为是克隆的核酸的大约 10^3 倍，并且是基因组靶核酸的大约 10^6 倍。最优选为每个反应引物浓度为大约100皮摩尔。在任一种情况下，在有脱氧核糖核苷或核糖核苷三磷酸存在下，加入合适的聚合酶。合适的聚合酶包括任何来自真核的或原核的有机体或病毒的RNA或DNA聚合酶。优选的聚合酶包括T7DNA聚合酶和E. coli DNA聚合酶全酶或Klenow片段。该核苷三磷酸优选为脱氧核苷三磷酸，并且每种dNTP是以大约100-300 μ M的浓度存在的。引物延伸最优选是在缓冲液中进行的，该缓冲液还含有大约5-15mM Mg^{2+} 、1mM二硫苏糖醇(DTT)的固相和磁性引物各0.5mM、

0 - 5mM 的三甲铵乙内酯, 并且由于存在有大约 10 - 20mM Tris- HCl 其 pH 为大约 7 - 8, 或者该缓冲液为这一 pH 值的 N - 2 - 羟乙基哌嗪 - N' - 2 - 乙磺酸(HEPES)缓冲液.

一旦固相引物已被结合到靶核酸的一条链中, 并且磁性引物已被结合到相反链中, 就可以通过施加电磁场来进行所有进一步的分离步骤. 如图 2 所示, 使一条链结合到固相或不动相上, 并且通过电磁力牵引另一条链, 结果破坏碱基堆积和链间的氢键相互作用, 最后导致链分离. 施加到双链靶核酸的电磁力必须强到足以破坏碱基堆积和链间的氢键作用, 但不致于强到破坏各个链中的共价键相互作用.

打破 DNA 分子中最弱的链内键所需的力为大约 368,000 焦/摩尔, 或者为大约 6×10^{-19} 焦/分子. 由于功(W) = 力(F) × 距离(D), 那么使链内断裂必需的最小力为 $F = W/D$. 对于 DNA, 力作用的距离为 3.3×10^{-10} 米/分子(参见 Smith 等人, 1992, “科学” (Science) 258:1122 - 1126). 因此, 最小链内断裂力,

$$F_s = \frac{6 \times 10^{-19} \text{ 焦/分子}}{3.3 \times 10^{-10} \text{ 米/分子}} = 1 \times 10^{-9} \text{ 焦/摩尔} = 1 \times 10^{-9} \text{ 牛顿(N)}.$$

相反, 破坏 DNA 双螺旋分子必需的力是根据第一等式:

$$2f/[1 - f]^2 C_0 = \exp(-\Delta G^\circ / RT)$$

其中, C_0 = 单链 DNA 的浓度;

在 $T = T_{90}$ (90 % 解链的温度)时, $f = 0.9$;

在 $T = T_{50}$ (50 % 解链的温度 = T_m)时, $f = 0.5$;

并且, 在 $T = T_{10}$ (10 % 解链的温度)时, $f = 0.1$.

ΔG 和温度的关系遵循 Gibbs - Helmholtz 公式的综合式:

$$\Delta G = -T \Delta S + \Delta H$$

因此, 对于一个 200 碱基的分子,

$$\Delta G^\circ = 31.4 - \Delta G + (\text{起始能}) = 26.5 \text{ 千卡/摩尔}$$

$$\Delta S^\circ = 0.3298 \text{ 千卡/摩尔}$$

$$\Delta H^\circ = 148.8 \text{ 千卡/摩尔, 并且}$$

$$\Delta G_{90} - \Delta G_{10} = 31 \text{ 千卡/摩尔, 或大约 } 2 \times 10^{-19} \text{ 焦/分子.}$$

因此,

$$FD = \frac{2 \times 10^{-19} \text{ 焦/分子}}{3.3 \times 10^{-10} \text{ 米/分子}} = 1.6 \times 10^{-10} \text{ 牛顿。}$$

5 根据这些数值，直到要解链的双螺旋达到 600b.p.(碱基对)，分离力 F_D 才接近断裂力 F_s 。不过，远远低于这个大小范围时，双螺旋解链变得有协同性，使得在远远达不到 F_s 的条件下完全分离。

如所指出的，在接近双螺旋解链的温度下进行解链是有利的。不过，该解链必须在不灭活用于引物延伸的聚合酶的温度下发生。因此，优选使用降低双螺旋的解链温度(T_m)的反应剂。例如，浓度大于 5M 的两性离子三甲铵乙内酯，在不影响中性 pH 条件下的蛋白质 - DNA 相互作用时，能使小牛胸腺 DNA 的解链温度由大约 62 °C 转变成大约 48 °C。因此，在一个优选的实施方案中，MCR 是在含有浓度大于 1M 的三甲铵乙内酯的缓冲液中进行
10 的，最优选是含有大约 5.2M - 5.6M 的三甲铵乙内酯。或者，通过大约 2.4M 盐酸三乙铵的存在降低解链温度。应该指出的是，在涉及更长的靶核酸或者 G + C 含量较高的靶核酸时，使用这些试剂来降低解链温度更加可取。通过
15 加入单链结合(ssb)蛋白，如 E. coli ssb 和/或解旋酶 E. coli DNA 解旋酶 I、II 和 IV，可以达到对双螺旋进一步去稳定[参见 Wood 和 Matson, 1987 “生物化学杂志”(J. Biol. Chem.) 262:152 - 169，以及 1989，“生物化学杂志”(J. Biol. Chem. 264:82 - 97)]。还可加入有限剂量的其他化学变性剂来进一步降低解
20 链温度。这些变性剂包括低级烷基(1 - 4C)醇、脲、甲酰胺和其他氢键竞争剂。在使用这些化学变性剂时，必须注意确使其量不会使聚合酶过度去稳定。恰当地使用这些化学剂可能实际上起相反的作用。例如 10 % 的乙醇实际上使聚合酶稳定。MCR 反应缓冲液中的各种氢键去稳定剂的结合使靶核酸解链温度降低，以致于可在刚好低于 DNA 解链温度的温度下进行 MCR，但在这一
25 温度下中温聚合酶仍然是稳定而有活性的。在这些条件下进行 MCR 确保了分离靶核酸链所需的力恰好低于链内共价键发生断裂的水平。

在另一方面，本发明提供了用于测定样品中特异靶核酸丰度的快速定量分析的装置。在利用聚合酶链式反应中，这样的定量分析是众所周知的。[参见，例如，Noonan 等人，1990，“美国国家科学院院刊”(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 87:7160 - 7164]。在熟知的定量分析中，可将如本发明的方法，
30 MCR，简单地用来替代 PCR。由于 MCR 的相对于 PCR 的速度，可以在比

用现有分析的时间少得多的时间内进行 MCR 定量分析。

在又一个方面，本发明提供了一种改进的、用来制备克隆、序列分析或诱变的底物核酸分子的方法的装置。由于中温聚合酶有更大的保真性，本发明的方法提供的底物，比那些用现有扩增方法产生的底物的突变要少得多。

5 因此，本发明方法能提供用于随后的分子生物学操作的更可信的底物。

在又一个方面，本发明提供了使大尺度基因作图更为便利的装置。由于中温聚合酶能扩增 100 - 200 千碱基大小范围的靶核酸，使大尺度基因作图成为可能。目前，仅通过稍微麻烦地将 DNA 克隆到酵母人工染色体(YACs)中就可以对超过这一大小范围进行作图。不过，能够扩增这样大的靶核酸片
10 段，提供了更为简单的方法。由于序列标志位点(STSs)被鉴别是在基因组中，相距 50 - 100kb(参见，例如，Olson 等人，1989，“科学”(Science)245:1434 - 1435)，通过本发明的方法，可以方便地扩增连串的 STSs 之间的区域，从而为用常规方法进行更精确地作图提供了底物。

以下的实施例是要对一些优选的实施方案作进一步描述，而不是在实质
15 上限制本发明。

实施例 1

测定由电磁场中特定的磁性粒子提供的有效最大力

由 Dynal, Oslo, Norway 获得 Dyna beadTM 顺磁粒子。通过测量该粒子随电磁场在微室中穿过缓冲液时的速度，来测定作用于该粒子上的最大磁
20 力。该微室由一个玻璃载物片和密封的盖玻片构成，二者之间的空间充满 MCR 缓冲液(参见以下的实施例 4)。将粒子放置在密封的充满液体的室的一头。然后用筒形电磁线圈围绕玻璃载物片，把电流通过线圈以产生电磁场。将计算机指示器光标叠加在显微图像上并用它来记录粒子的速度，由于粒子之间有差异，对不同的粒子进行测量。对于理论上将 10^{-10} 、 5×10^{-9} 、
25 10^{-8} 、 5×10^{-8} 、 10^{-7} 和 5×10^{-7} 牛顿的力施加在粒子上的场强，来测量速度。然后通过将观测到的粒子的速度平均并应用 Stoke 关系式来确定不同粒子的平均有效最大力。Stoke 关系式：

$$FM = 6 \pi \eta r v$$

其中 r 是粒子的半径， η 是缓冲液的粘度，并且 V 是粒子的速度。再将
30 这个值与电磁场本应该施加到粒子上的理论力相比较，并用这个值来校正要用于以下实施例的电磁场。

实施例 2

确定导致链内共价键断裂所需的最小力

在除去 5'-二甲氧基三苯甲基(DMT)之前,用标准方法将 50 - 体寡聚脱氧核苷酸于其 3'-OH 位置生物素化。然后在乙酸水溶液中除去 DMT 基,并于 C₁₈ 高效液相色谱(HPLC)仪上纯化该寡核苷酸。如标准方法,用烷基酰胺丙酸涂覆玻璃显微载物片。再将该生物素化的寡核苷酸直接与烷基酰胺丙酸的羧基酯化。下一步,把缀合了亲和素的 Dynabead™ 顺磁粒子加到载物片的目标部分,并冲洗掉未结合的粒子。然后用 MCR 缓冲液(见实施例 4)浸渍目标部分,并加上盖片。把载物片用筒形电磁线圈围绕起来,由通过筒形线圈的电流产生合适场强的电磁场,来对每一粒子产生 10^{-10} N 的有效力。将有效力增加,直至寡核苷酸于大约 10^{-9} N 的力时发生断裂。

$$6 \times 10^{-19} \text{ 焦/分子(DNA 中最低键裂解能)}$$

$$F = W/D = \frac{3.3 \times 10^{-10} \text{ 米(单个核苷酸间连键的最大长度)}}{10^{-10} \text{ 米}}$$

因而, $F = \sim 2 \times 10^{-9} \text{ 焦/分子} = \sim 2 \times 10^{-9} \text{ 牛顿}$ 。

实施例 3

确定使寡核苷酸双螺旋去稳定化必需的最小力

把 3'乙酰丙酸基 - 寡核苷酸(50 - 体,同实施例 2 中)通过其 5'-羟基直接与涂覆玻璃显微载物片的烷基酰胺基丙酸的羧基酯化。然后在碱中除去乙酰丙酸保护基。然后在含有 T7 DNA 聚合酶的 MCR 缓冲液中加入 5'-顺磁粒子 - 衍生的 50 - 体寡核苷酸,其中 50 - 体寡核苷酸的最靠近 3'端的 10 个核苷酸与和玻璃结合的寡核苷酸的最靠近 3'端的 10 个核苷酸互补。(见实施例 4)。该寡核苷酸延伸,产生 90 - 体的双螺旋。加上盖片,该显微镜载物片被环绕在一个筒形电磁线圈中,将其放在显微镜载物台上。再向该筒形电磁线圈通入电流,对顺磁粒子产生大约 10^{-10} 牛顿的有效力。将力逐渐增加,直至在大约 6.1×10^{-10} 牛顿的力的作用下,双螺旋的链分开。

实施例 4

证实应用电磁力的链分离

通过施加由上述 MCR 装置产生的具有一定场强的电磁场产生力,测定该力有分离 750bp 的双链 DNA 分子的能力。此外,还将用于这一测定的验证法用来检测伴随着 DNA 双螺旋变性的链的断裂。

用于本实验定法的实验流程见表 6。预备 2 种型号的微孔滴定孔。在 2 种孔中, 大约 0.2 皮摩尔的 750 核苷酸的单链 DNA 片段被共价地连接到微孔滴定孔上。在孔 A 中, DNA 片段未标记, 而在孔 B 中, DNA 片段于其 5'端被放射标记。将这些孔中每一孔的 750 核苷酸的片段和 500 核苷酸的单链 DNA 分子退火, 该 500 核苷酸的单链 DNA 分子与 750 核苷酸片段的 3'端的 500 个核苷酸互补。把该 500 核苷酸片段在其 5'端生物素化, 并非共价地连接到涂覆了链霉抗生物素蛋白的粒子上。在有合适的缓冲液、盐和 dNTPs 存在下加入 T7 DNA 聚合物, 使 500 核苷酸片段延伸。在孔 A 中, 是在有(^{32}P)-标记的 dCTP 存在下进行延伸, 而在孔 B 中没有放射活性的 dNTPs。在延伸后, 通过在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下施加如上所述的外在的磁场把延伸了的链分离。然后如以下实施例 7 用甲酰胺溶液洗脱延伸产物, 并通过电泳进行分析。再把各孔加热至 90 $^{\circ}\text{C}$, 对得到的上清液也进行电泳分析。

这些实验的结果见表 7。列出放射标记的 750 核苷酸的模板的一个例子用作对照。在来自孔 A 的例子中, 所见的放射标记的(延伸的)DNA 是一条宽的 500 - 750 核苷酸的成片条带, 其代表的是一群延伸至不同长度的 DNA 分子。在 90 $^{\circ}\text{C}$ 下进一步热变性表明基本上没有另外的放射标记的 DNA, 说明这些实验中的磁性分离是定量的。在 50 $^{\circ}\text{C}$ 或 90 $^{\circ}\text{C}$ 下, 孔 B 均表明无放射标记的 DNA, 说明在无严重的链断裂的同时达到了进行磁性分离, 并且放射标记的模板链的共价结合对加热至 90 $^{\circ}\text{C}$ 是稳定的。

这些结果证明, 如实施例 1 - 3 中的理论探讨所预计的, 应用外加的磁场, 无伴随的链断裂的同时, 可将至少 750 核苷酸的 DNA 片段进行定量分离。

实施例 5

用 MCR 进行 DNA 序列扩增的装置

按如下方法来组建 MCR 装置。由 13cm \times 9cm \times 1.25cm 铸造铝块制作两个磁元件。在铝块上磨制 4 \times 6 列共 24 个、大小是 1cm 深和直径为 2cm 的孔, 其中各孔的中心与其相邻的孔的中心相距大约 2.1cm。在表 4 中对这一排列进行了说明。在每一孔中放置一个如下制作的电磁线圈元件。用 36AWG 的磁性金属线缠绕大小为大约 1cm \times 0.5cm 的软铁心, 大约缠 1875 圈, 产生最后大小为 1cm 高 \times 2cm 直径的线圈。放置线圈后, 将该铝块沿一个侧面固定到一块 13cm \times 9cm \times 0.25cm 的软铁片上。

利用以下等式:

$$B = n(2 \pi k'I/r)$$

其中, B 是以泰斯拉(tesla)为单位的磁通量,

I 是以安培(A)为单位的电流,

5 n 是电磁线圈的匝数

k'是比例常数 = 10^{-7} 泰斯拉·米/安培

r 是以米为单位的线圈的半径。

预计对于 500 毫安(mA)的电流(I), 本发明的每一线圈产生的磁场为大约 5.9×10^{-3} tesla.

10 利用以下等式:

$$F = B(I)l$$

其中, F 为以牛顿为单位的力,

B 为以 tesla 为单位的磁通量,

I 是以安培(A)为单位的电流,

15 l 是以米为单位的线圈的长度。

进一步预测得, 如上所述的 24 - 线圈组会产生大约 7×10^{-7} 牛顿的力。

把如上所述的磁性元件放置在距如下制作的恒温样品元件的工作距离内。该样品元件由铸造铝制成, 包括一组 24 - 96 个的磁循环反应样品管孔, 这些孔均匀地分布在铝块的一个表面上。把这些样品管孔制成能容纳容量为
20 1.5ml、0.6ml 或 0.2ml 的多个样品管, 该装置的样品元件的尺寸为 13cm × 9cm × 6cm。把该元件放置于应用的控制器监控的反馈控制器的恒温条件下。最后, 使该元件与一个嵌入的、操作地连接到控制器上的铂丝热敏电阻有热接触。该元件还与一组 3 个 12V DC 的耐热元件有热接触。该元件的吹风冷却是由一个 12V DC 风扇和散热器提供的, 或者由与样品元件有热接触
25 并操作地连接到控制器上的 Peltier 热泵来提供。设计该控制器来避免加热和冷却元件同时启动。

该控制器是 Packard Bell Pentium/60MHz 的计算机, 它配备有 8 兆字节的随机存取的存储器(RAM), 并且用 Microsoft Basic 软件编程的 420 兆字节(MB)的硬驱。该计算机利用 Omega OM - 900 界面(Omega Engineering,
30 Stamford, CT)、特别是利用下述模块来监控和控制该系统的其它元件: 应用 8088 信息处理系统的 OM - 991 CPU、OM - 932 RTD 输入模块、OM -

991 通用输入/输出(I/O)模块以及 OM - 903 电源。使该程序具体来为用户提供对以下各方面的控制: 操纵温度、磁循环反应的循环次数、每一循环持续的时间、以及每一循环的变性、退火和延伸的各步骤的持续时间(时间)。在如本文中所述来制作这一装置时, 把控制器操作地连接到每一个磁元件、恒温样品元件的加热和冷却元件以及电源上。

用操作地连接到控制器上的 12V、5A DC 电源来对该装置供电。

在图 3 中对本发明的装置的各个元件的配置进行了说明。

实施例 6

利用 MCR 扩增一个靶核酸序列的扩增方案

- 10 用 Pvu II 把 pBlue script[™] SK + 1 - 载体线性化, 按如下方法来扩增一个 210 碱基对(b.p)的跨越多接头的片段。把 1 纳克(ng)酶切消化的质粒加入到盛有含以下物质溶液的微量离心管中, 这些物质是 15mM Tris - HCL(pH 7.5)、10mM MgCl₂、1mM 二硫苏糖醇(DTT)、0.2mM dNTPs、0.5mM 固相引物和 0.5mM 的三甲铵乙内酯。
- 15 固相引物为 5' - AACAGCTATGACCATG - 3'(序列 1), 其 5'羟基与烷基酰胺丙酸 - 可控孔度玻璃的羧基酯化。磁性引物是 5' - GTAAAACGACGGCCAT - 3'(序列 2), 其 5'端被生物素化, 并被连接到链霉抗生物素蛋白衍生的 Dynabead[™]上。把该溶液加热至 97 °C, 并持续 2 分钟, 然后再冷却至 50 °C。加入 10 个单位的 T7 DNA 聚合酶, 再将溶液于 45 °C 下
- 20 温育 2 分钟。把溶液转移到 MCR 仪中, 在 45 - 50 °C 下, 把微量离心管放置在线圈中。然后施加一定场强的电磁场, 并持续 15 秒, 该场强使双螺旋的链分离, 但不会导致链内断裂(如, 施加在每一磁性粒子上的有效最大力为大约 5×10^{-11} - 1×10^{-9} N 的场强), 然后使电磁场反向并持续 5 秒, 并于 45 - 50 °C 下把溶液温育 2 分钟。再将这些电磁脉冲和温育步骤重复大约 20
- 25 次。然后在凝胶电泳上分析得到的 210bp 的扩增产物。在图 1 中以流程图对该方案进行了说明。

实施例 7

利用 MCR 扩增靶 DNA 序列

- 配制一种 MCR 反应混合物, 其在含下述物质的溶液中含有 30 渺摩尔 (attomoles) 的线性 λ 噬菌体(Lambda phage)DNA(- 100pg), 这些物质是: 15mM Tris HCl(pH 7.5)、12mM MgCl₂、50mM NaCl、1mM 二硫苏糖醇、

0.05mM 的各种 dNTP、5 % 甘油、5 % 亚乙基甘油、0.1 % 吐温(TWEEN) 去污剂以及 0.5mM 两种寡核苷酸引物。这两个引物中的一个为磁性引物，其在 5'端被生物素化，并被非共价地连接到链霉抗生物素蛋白涂覆的顺磁粒子 (Dynabead[™]) 上。该磁性引物的核苷酸顺序为：5' -

5 CGAACAGGTTATCGAATTCAGCCAC - 3'(序列 3)。另一引物为固相引物，通过 5'末端的磷酸基团，其被共价地结合在微孔滴定板(Coualink, Nunc Inc., Naperville, IL)的孔底部，孔中含有进行 MCR 扩增的反应载体。该固相引物的核苷酸顺序为：5' - CATCGTCGTGTATTCCGGACAGTAC - 3'(序列 4)。

把该 MCR 反应混合物加热至 94 °C，持续 1 分钟，冷却至 50 °C，并加入 1 - 2 个单位的 T7DNA 聚合酶，在 50 °C 下继续温育大约 1 分钟。然后把溶液加热至 94 °C，持续大约 1 分钟，再冷却至 50 °C，并放入如上述的 MCR 装置。

向 MCR 反应混合物加入 1 - 2 个单位的 T7DNA 聚合酶，于 45 - 50 °C 下温育，持续 MCR 扩增的时间。施加通过 MCR 装置的线圈产生的电磁场，持续大约 5 秒钟，再使场的极性相反，持续大约 5 秒钟，然后在无外加磁场下温育大约 5 秒钟。把该电磁脉冲和温育的循环另外重复 20 次。然后在 90 % 甲酰胺/10mM EDTA(乙二胺四乙酸)的溶液中将得到的 750bp 的 DNA 产物从 Dynabeads 上洗脱下来，并通过凝胶电泳来进行分析。该电泳分析的结果证实了对特异的 750bp MCR 产物的扩增。在图 1 中以流程图形式对这一方案进行了说明。

应该明了的是，前述的说明强调了本发明的某些特定的实施方案，所有修改或其可选择的均等方案都是如在附上的权利要求中所陈述的本发明的构思和范围之内。

序列表

(1)一般资料:

(i)申请人:

- 5 (A)名称: Gamera Bioscience ;
(B)街道: Memorial Drive 30 号;
(C)城市: Cambridge
(D)州: 麻萨诸塞
(E)国家: 美国
10 (F)邮编: (ZIP): 02142
(G)电话: (617)441 - 1080
(H)传真: (617)441 - 1010

(ii)发明名称: 一种进行磁循环反应的装置

(iii)序列数目: 4

15 (iv)计算机可读形式:

- (A)媒介类型: 软盘
(B)计算机: IBM PC 兼容
(C)操作系统: PC - DOS/MS - DOS
(D)软件: PatentIn Release # 1.0, # 1.25 版(EPO)

20 (v)当前申请数据:

申请号: PCT/US95/

(2)序列 1 资料:

(i)序列特征:

- (A)长度: 16 个碱基对;
25 (B)类型: 核酸;
(C)链型: 单股
(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组)

(xi)序列描述: 序列 1:

30 AACAGCTATG ACCATG

(2)序列 2 资料:

- (i)序列特征:
- (A)长度: 16 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单股
 - (D)拓扑结构: 线性
- 5 (ii)序列描述: 序列 2:
GTAAAACGAC GGCCAT
- (2)序列资料 3:
- (i)序列特征:
- 10 (A)长度: 25 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单股
 - (D)拓扑结构: 线性
- (ii)分子类型: DNA(基因组)
- 15 (xi)序列描述: 序列 3
CGAACAGGTT ATCGAATTCA GCCAC
- (2)序列 4 资料:
- (i)序列特征:
- 20 (A)长度: 25 个碱基对
 - (B)类型: 核酸
 - (C)链型: 单股
 - (D)拓扑结构: 线性
- (ii)分子类型: DNA(基因组)
- (xi)序列描述: 序列 4
- 25 CATCGTCGTG TATTCCGGAC AGTAC

说明书附图

图 1A

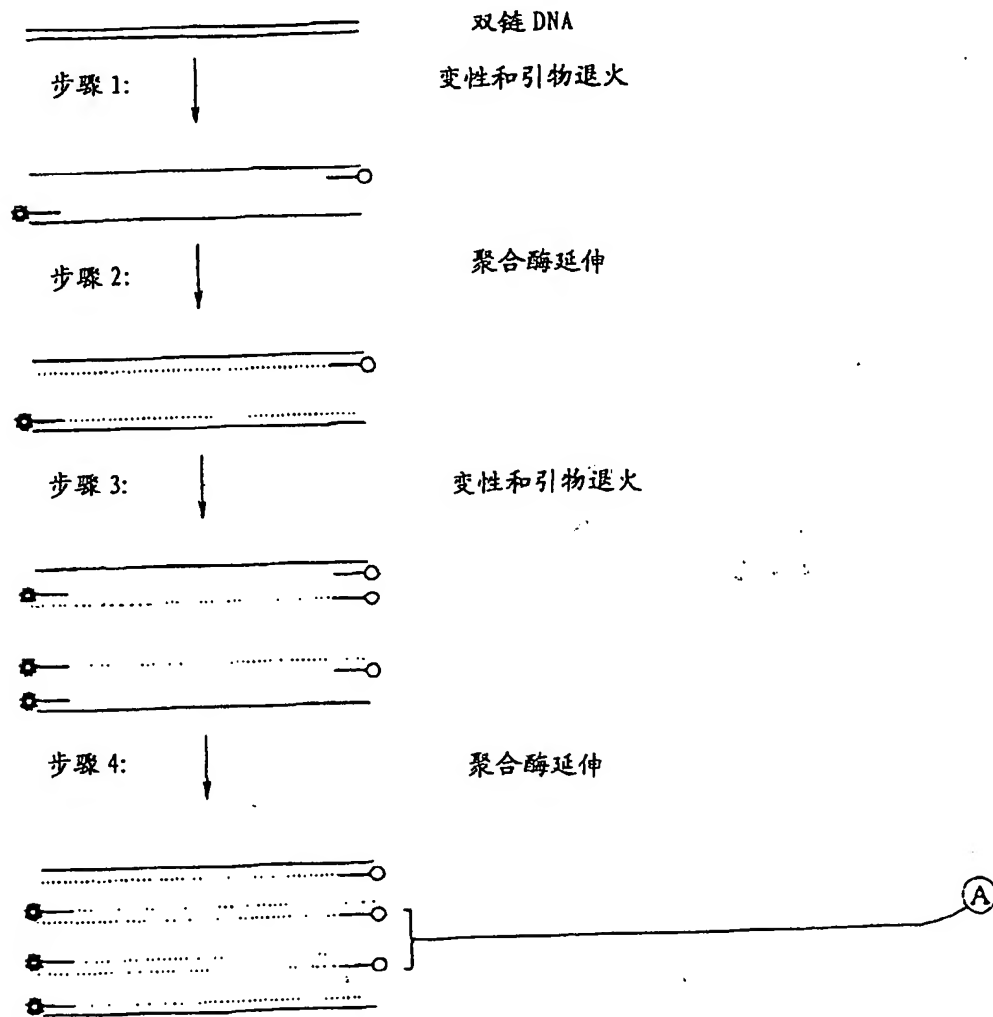


图 1B

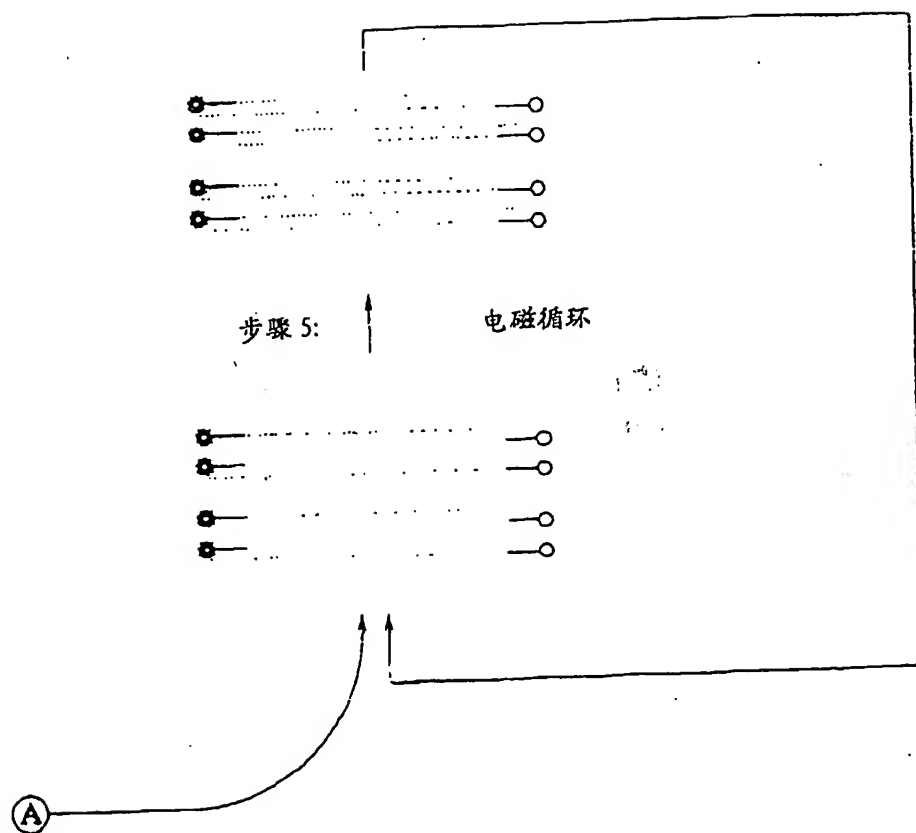


图 2A

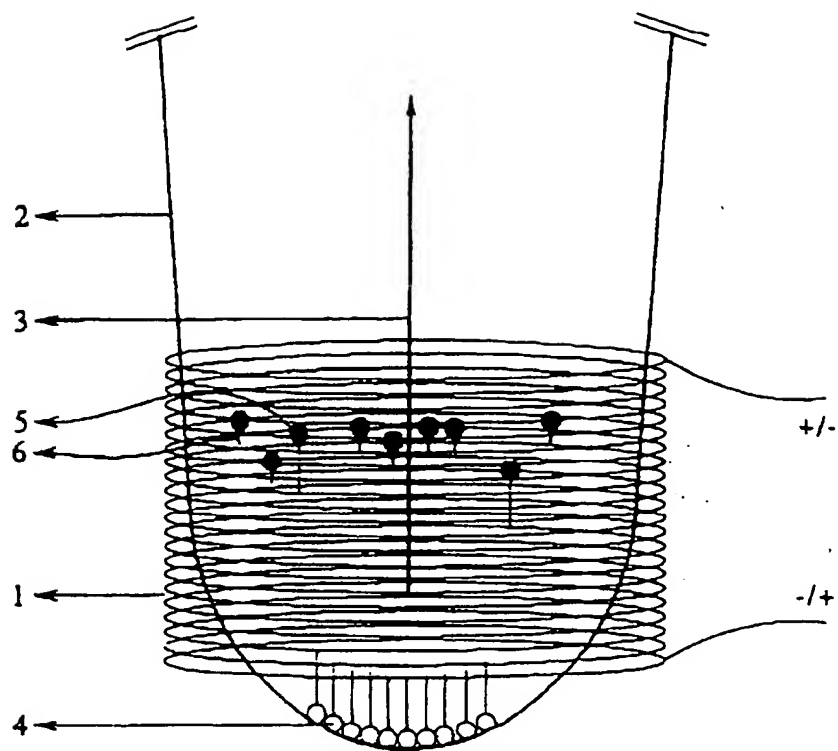


图 2B

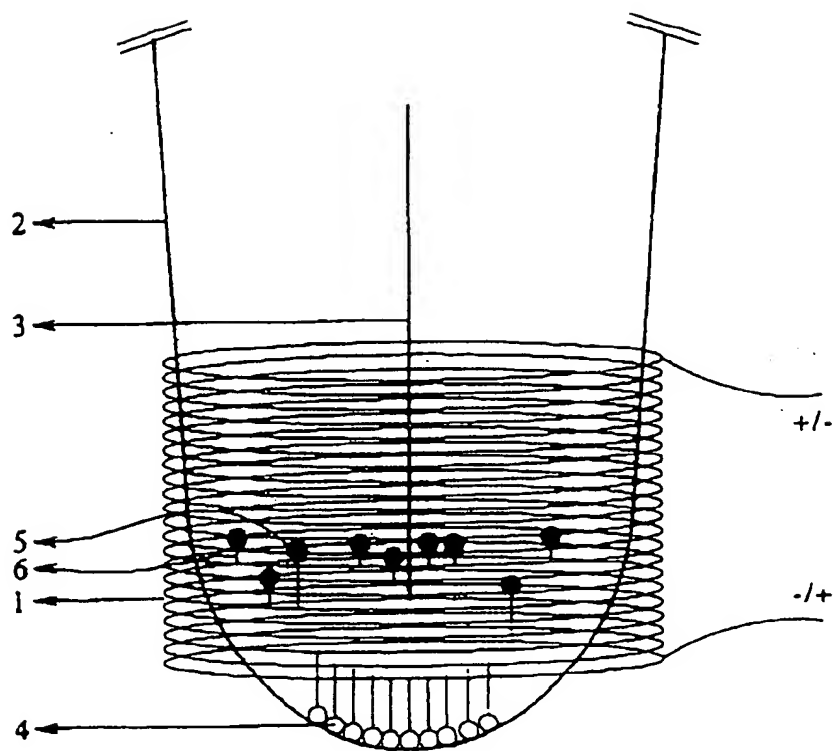


图 3A

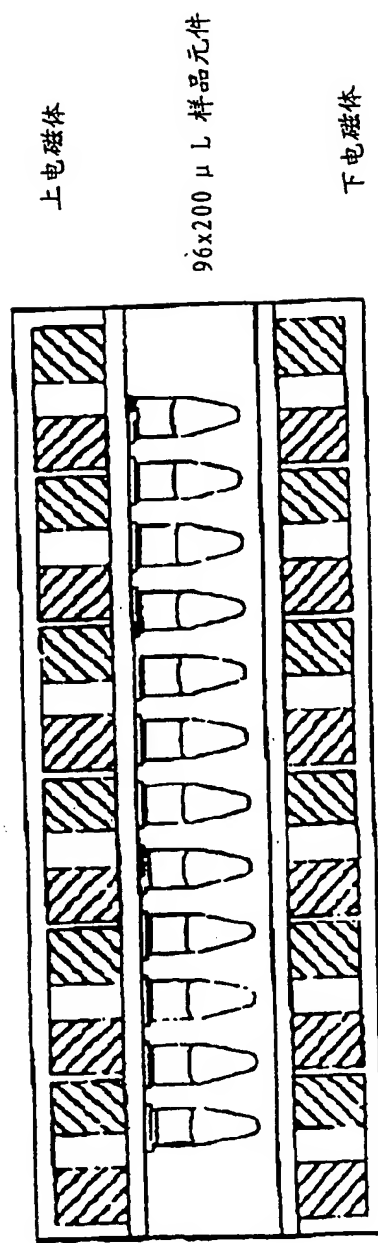


图 3B

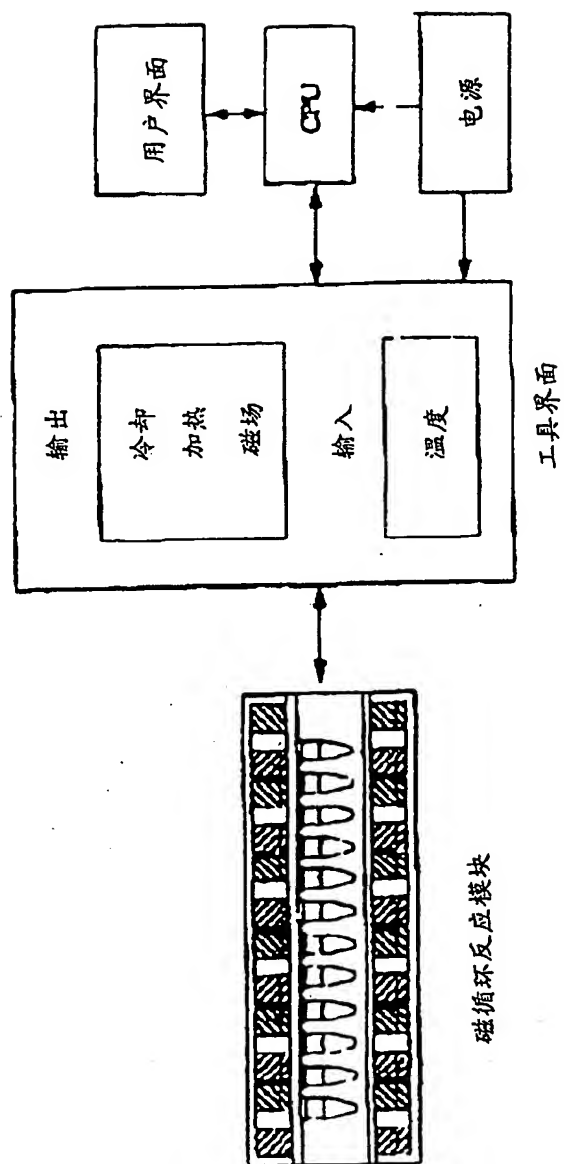
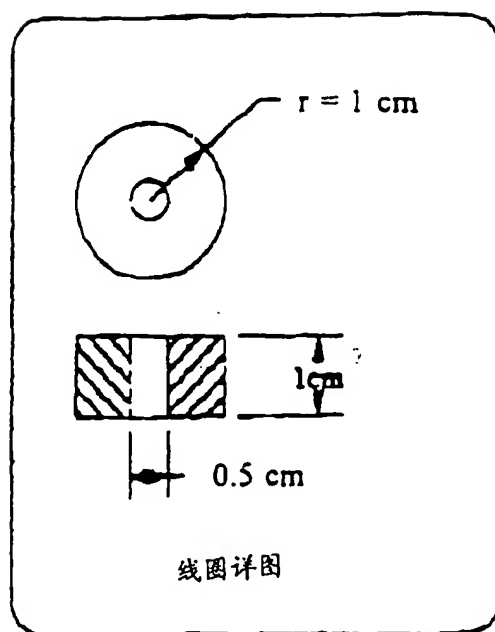
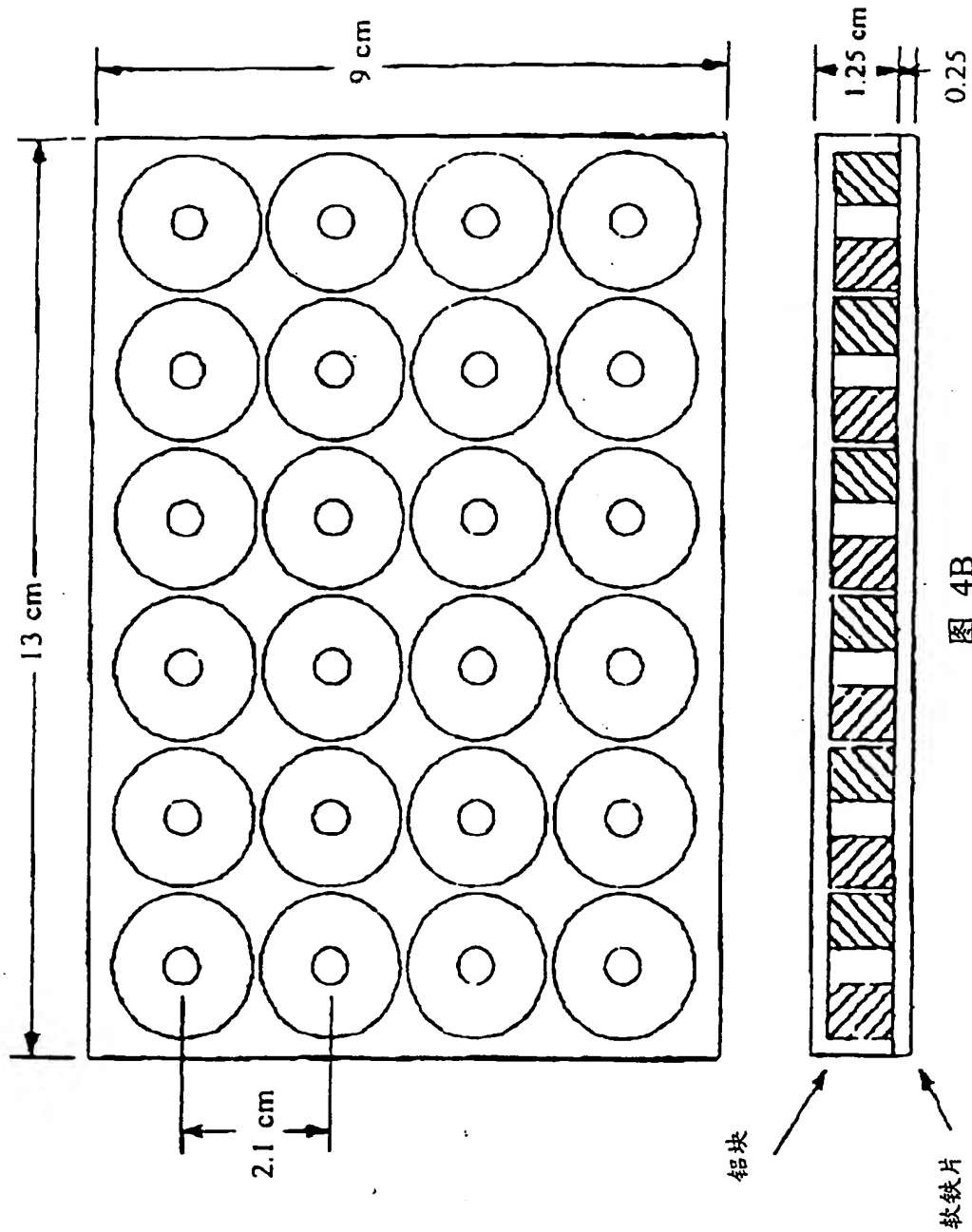


图 4A





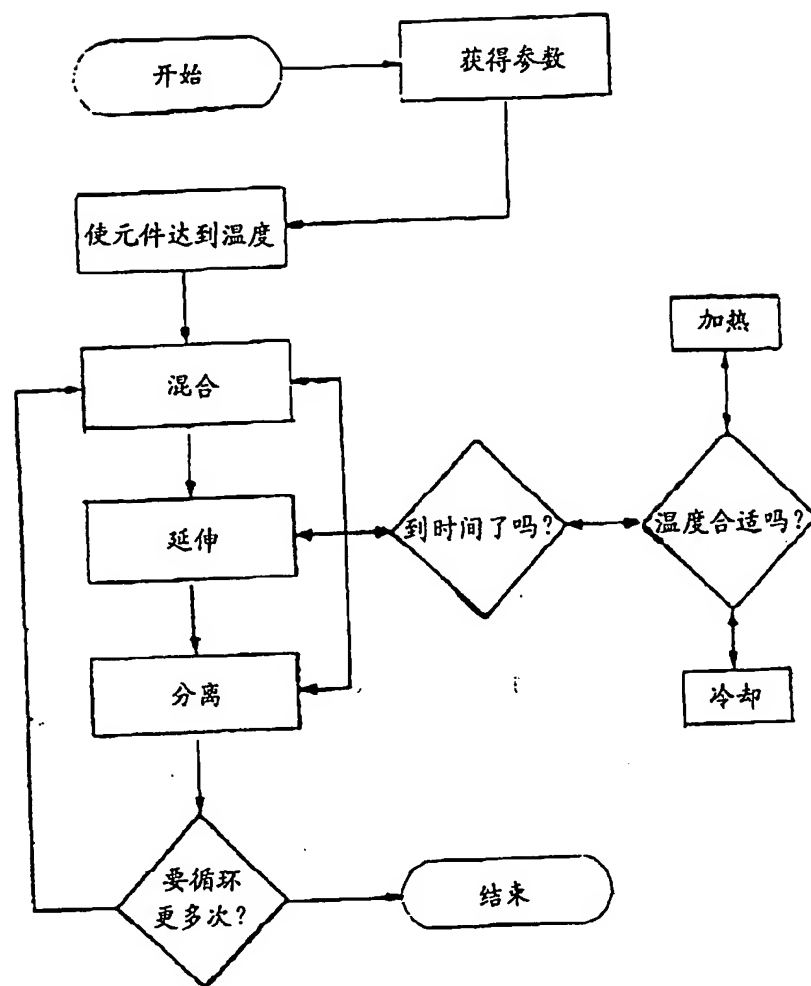
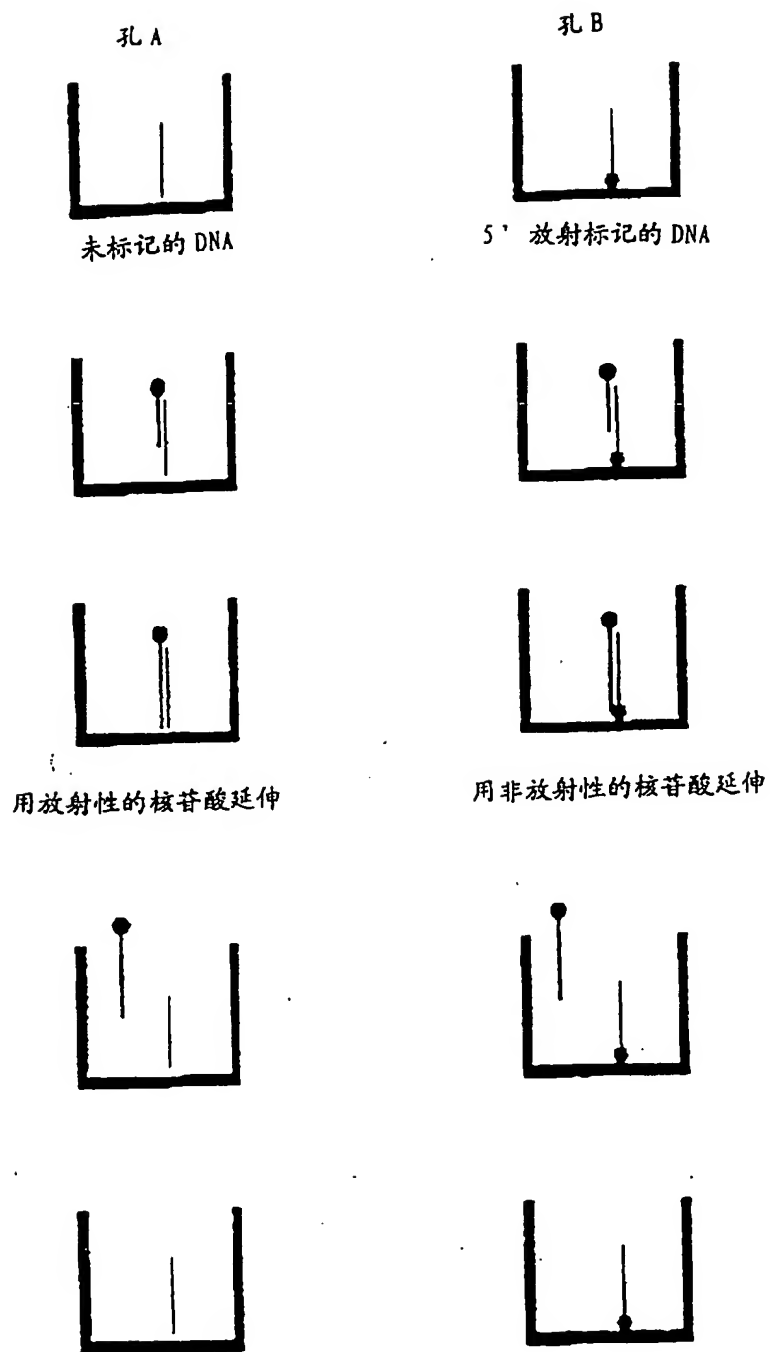


图 5

图 6



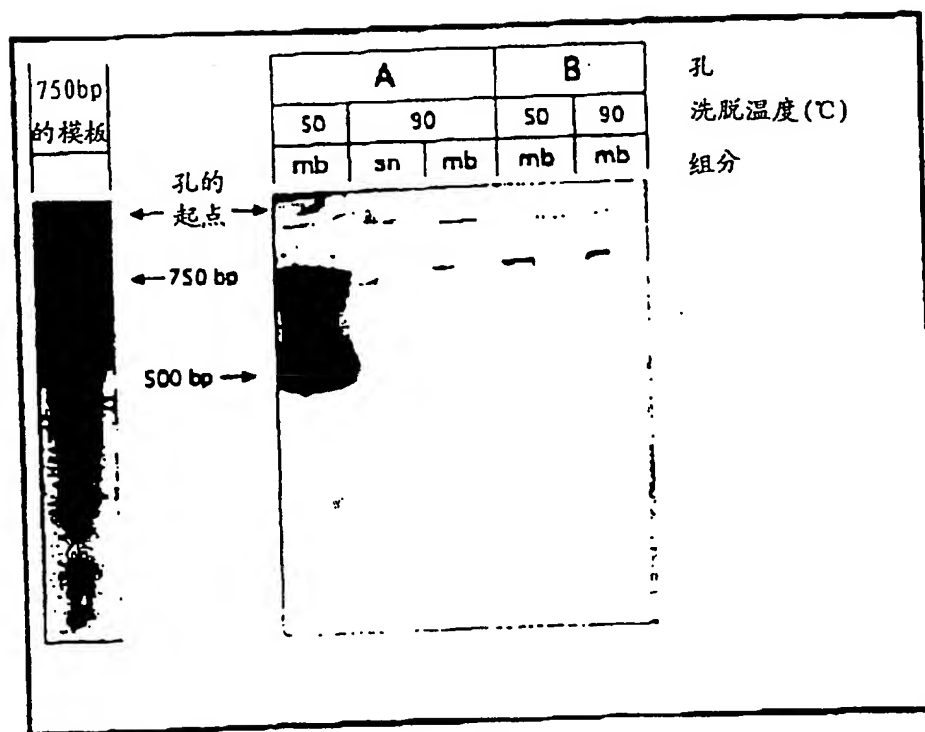


图 7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.